

ARTIGO ORIGINAL

Acta Med Port 2010; 23: 005-014

CARCINOMA GÁSTRICO E GASTRITE CRÓNICA

Regulação Epigenética por Metilação dos genes *CDH1* (Caderina-E), *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*), *PTGS2* (*COX2*) e *EGFR*

Maria SILVA, Diana AZENHA, César PEREIRA, Anabela ALMEIDA, Sandra
BALSEIRO, Ana Maria SAMPAIO, Paulo SANTOS, Lina CARVALHO

RESUMO

As alterações genéticas e epigenéticas estão a ser estudadas como causas de progressão e desenvolvimento do carcinoma gástrico (CG). A metilação do DNA é uma alteração epigenética que provoca o silenciamento de genes supressores e activação de proto-oncogenes, facilitando a carcinogénese. Os vários tipos histológicos de carcinoma gástrico têm percursos genéticos diferentes, sendo que o conhecimento das bases moleculares da histogénese e progressão tumoral levaria à acuidade diagnóstica e terapêutica atempada. Os genes *CDH1* (caderina-E) e *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*) são considerados genes supressores tumorais e os genes *PTGS2* (*COX2*) e *EGFR* estão envolvidos na regulação celular e crescimento tumoral. Assim sendo, o silenciamento de genes como fenómeno epigenético por um lado, e o aumento da expressão de genes devido à possível desmetilação, simultaneamente, podem facilitar a carcinogénese e a progressão tumoral.

Pretendeu-se relacionar a metilação do promotor dos genes *CDH1*, *p16^{INK4A}*, *COX-2* e *EGFR* com os vários tipos histológicos do carcinoma gástrico e com a gastrite crónica (GC).

Estudaram-se 55 biópsias gástricas fixadas em formol e incluídas em parafina, em que 35 correspondiam a CG: 12 carcinomas do tipo difuso de Laurén, 15 do tipo intestinal de Laurén e oito do tipo indeterminado. As restantes 20 amostras apresentavam GC. Após extração, o DNA foi sujeito a tratamento com bissulfito de sódio e prosseguiu-se para *Methylation Specific PCR* (MSP). A análise estatística foi efectuada com base nos testes χ^2 e Exato de Fisher.

A metilação das ilhas CpG foi detectada em 94% das amostras de CG para *CDH1*, 91% para *COX-2*, 80% para *p16^{INK4A}* e para *EGFR* não foi detectada metilação (0%). No caso da GC foi detectada metilação das ilhas CpG em 100% para *CDH1*, 100% para *COX-2*, 90% para *p16^{INK4A}* e 20% para *EGFR*.

Estes resultados revelaram diferenças significativas na metilação do gene *EGFR* entre o CG e a GC ($p < 0,01$), podendo sugerir que a desmetilação do gene poderá conduzir à transformação maligna e também favorecer a utilização dos fármacos inibidores da tirosinase do *EGFR*. A menor metilação dos genes *COX2* e *p16^{INK4A}*, no carcinoma gástrico do tipo intestinal e difuso, traduz a sua importância na histogénese respectiva.

M.S., A.A., S.B., A.M.S., D.A.,
C.P.: Laboratório de Análises
Clínicas. Escola Superior de
Tecnologia de Saúde de Coim-
bra. Coimbra
P.S., L.C.: Serviço de Anato-
mia Patológica. Faculdade de
Medicina da Universidade de
Coimbra. Coimbra

© 2010 CELOM

SUMMARY

GASTRIC CARCINOMA AND CHRONIC GASTRITIS Epigenetic Regulation of *CDH1* (E-Cadherin), *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*), *PTGS2* (*COX-2*) and *EGFR* Genes Through Methylation

The genetic and epigenetic alterations are being studied as one of the causes of gastric cancer (GC) progression and development. DNA methylation is an epigenetic alteration which leads to suppressor gene silencing and proto-oncogene activation, playing an important role in carcinogenesis. The histological types of gastric carcinoma have different genetic paths and the knowledge of the molecular bases of tumoral progression leads to diagnostic accuracy and attempted therapy. *CDH1* (E-cadherin) and *CDKN2A* (*p16^{INK4A}*) genes are thought to be tumoral suppressor genes and *PTGS2* (*COX-2*) and genes are involved in tumour regulation and growth. In one hand, gene silencing as an epigenetic phenomenon, and in the other hand, gene expression enhancement due to possible demethylation, simultaneously, can facilitate carcinogenesis and tumoral progression.

Our aim was to relate *CDH1*, *p16^{INK4A}*, *COX-2* and *EGFR* genes DNA methylation with the several histological types of gastric carcinoma and chronic gastritis.

We studied 55 formalin fixed paraffin embedded gastric biopsies: 35 were GC specimens (12 diffuse type, 15 intestinal type and 8 indeterminate type, according to Laurén's classification) and 20 samples had chronic gastritis (CG). The DNA was treated with sodium bisulfite after extraction and then performed Methylation Specific PCR (MSP). Statistical analysis was based on χ^2 test and Exact Fisher's test.

CpG island methylation was detected in 94% of the GC samples for *CDH1*, 91% for *COX-2*, 80% for *p16^{INK4A}* and no methylation was detected in *EGFR* gene (0%). In CG, CpG island methylation was found in 100% for *CDH1* and *COX-2* genes, 90% for *p16^{INK4A}* and 20% for *EGFR*. These results reveal significant differences in *EGFR* gene methylation distinguishing GC from CG ($p < 0,01$), suggesting that gene demethylation leads to malignant transformation and favours the use of tyrosine-kinase inhibitors in its treatment. Genes *COX2* e *p16^{INK4A}* lower methylation in intestinal and diffuse types of GC, favours their different role in respective histogenesis.

INTRODUÇÃO

O Carcinoma Gástrico (CG) continua a ser a segunda causa de morte mais frequente por cancro (700000 mortes anuais) constituindo actualmente, o quarto tipo de cancro mais comum a nível mundial, precedido pelos cancros do pulmão, mama, cólon e recto. A sua etiologia é multifactorial, estando definidas associações entre os hábitos alimentares, factores ambientais e a infecção gástrica por *Helicobacter pylori*¹.

A classificação de Lauren define dois tipos histológicos principais de CG, o tipo intestinal e o tipo difuso e a patogénese e as alterações genéticas destes dois tipos de carcinoma são diferentes. O tipo intestinal é mais frequente e está relacionado com factores ambientais como sejam, a dieta (peixe salgado, carne, fumados) e ainda tabaco e álcool. A infecção por *Helicobacter pylori* está associada aos dois tipos de carcinoma gástrico. Para o tipo difuso está definido terreno genético^{2,3}.

Vários estudos indicam que o CG é o resultado de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes, genes supressores, genes reparadores de DNA, genes reguladores do ciclo celular e genes envolvidos na adesão celular que em conjunto são responsáveis pelo seu desenvolvimento e progressão⁴. Das várias alterações que conduzem a expressão alterada de genes, acredita-se que a mais importante seja a metilação do DNA. A hipermetilação das ilhas CpG está associada com o silenciamento de vários genes supressores e activação de proto-oncogenes que participam na génese tumoral^{2,3,5-7}. A hipermetilação é um fenómeno epigenético potencialmente reversível, podendo ser alvo de novas drogas anti-carcinogénicas desmetilantes⁶.

CDH1 é um gene supressor tumoral localizado no cromossoma 16q22.1 que codifica a caderina-E, tendo esta um papel importante na manutenção da diferenciação e polaridade celular e na arquitectura normal do tecido. Vários estudos demonstram que a metilação do promotor do

CDHI conduz a uma diminuição da transcrição do gene. A redução da expressão da caderina-E é vista como um dos mecanismos moleculares relacionados com a disfunção no sistema de adesão célula-célula, facilitando a proliferação e invasão neoplásica, com formação de metástases^{6,8,9}.

O locus *CDKN2A* no cromossoma 9p21 codifica duas proteínas supressoras tumorais diferentes: a *p16^{INK4A}* e a *p14^{ARF}*, que estão envolvidas na regulação negativa do ciclo celular, pelas vias pRb e p53, respectivamente, com função na inibição das cinases. A perda de função da proteína *p16^{INK4A}* resulta numa maior actividade da cinase correspondente, levando à fosforilação da proteína pRb, perdendo-se o controlo apoptótico e assim ocorre crescimento celular^{10,11}.

A Ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que limita a taxa de conversão do ácido araquidónico em prostaglandinas, também conhecida como PGHS (*Prostaglandin endoperoxide synthase*). Pode afectar a proliferação celular, a angiogénese, o metabolismo na célula neoplásica, a produção de moléculas reactivas de oxigénio ou modular o sistema imune. A expressão aumentada de COX-2 foi detectada em vários tipos de tumores e em lesões pré-neoplásicas. A mucosa gástrica expressa normalmente uma quantidade dificilmente detectável da proteína COX-2^{5,12,13}.

O Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) é uma glicoproteína de membrana pela qual ocorre o estímulo para a síntese de DNA e crescimento celular. Estudos demonstram que o EGFR é importante não só na proliferação celular, mas também em vários processos como a progressão tumoral, através da motilidade, adesão, invasão e sobrevivência celular e também contribui para a angiogénese. Tem um papel de relevo na regulação do crescimento do carcinoma gástrico¹⁴.

Os genes *COX-2* e *EGFR*, desregulados no carcinoma gástrico, através de mutações ou expressão aumentada, estão a ser estudados como possíveis alvos terapêuticos³.

Neste contexto, estudou-se a metilação do promotor dos genes referidos e investigou-se uma possível correlação entre a metilação e os diferentes tipos histológicos de CG e a GC, utilizando para isso, a MSP (*Methylation Specific PCR*).

MATERIALE MÉTODOS

Através de um estudo retrospectivo foram escolhidas 55 biópsias gástricas, entre os anos de 2004 e 2006, fixadas em formol e incluídas em parafina, dos arquivos do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. O estudo morfológico em hematoxilina-eosina e a presença de *H. pylori* identificada pela

técnica de Giemsa modificada, constavam do relatório histológico e os casos de carcinoma gástrico foram subdivididos em tipo difuso, intestinal e indeterminado, segundo a classificação de Laurén.

A população estudada era assim composta por 55 indivíduos, dos quais 30 eram do sexo masculino. Da amostra populacional, 35 tinham o diagnóstico de CG (idade média de $65,8 \pm 11,8$ anos), sendo 12 do tipo difuso, 15 do tipo intestinal e oito do tipo indeterminado.

Foram igualmente estudadas 20 biópsias com o diagnóstico de gastrite crónica, cujos doentes tinham idade média de 57 ± 13 anos, sendo oito do sexo masculino. Por observação prévia, foi detectado *H. pylori* em 10 destas amostras; nas restantes 10, não se detectou *H. pylori*, pela técnica de Giemsa modificada.

As amostras possuíam características topográficas diferentes; assim, 30 eram provenientes do antro, seis do corpo, dois do fundo, um do pré-píloro e 16 de topologia não determinada.

Extracção de DNA

Segundo o protocolo de extracção QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), procedeu-se ao corte de 5 a 8 secções de cada amostra, adicionando xilol e submetendo-as a tratamento com etanol. Após digestão com proteinase K, o DNA foi extraído e eluído recorrendo às colunas QIAamp Spin Column e à adição sucessiva de tampões.

Tratamento com Bissulfito e Methylation Specific PCR (MSP)

A metilação aberrante das ilhas CpG na região promotora dos genes foi determinada após modificação química com bissulfito de sódio do DNA extraído e subsequente PCR específica para DNA metilado (MSP).

O tratamento químico do DNA foi executado com o CpGenome DNA Modification Kit (Chemicon, Temecula, CA, EUA). Sumariamente, 1 µg de DNA genómico foi desnaturado com hidróxido de sódio e de seguida, modificado quimicamente por bissulfito de sódio durante 16 horas. Após o tratamento, as citosinas não metiladas foram convertidas em uracilo, enquanto que as citosinas metiladas permaneceram inalteradas. O DNA modificado é recuperado por precipitação com etanol e ressuspensão em tampão TE.

As sequências dos primers (Roche) basearam-se em artigos anteriores^{7,15}, estando listados na tabela 1. Um microlitro de DNA modificado com bissulfito foi amplificado num volume total de 10 µl contendo: 3 µl da mistura PCR GeneBox (600 µM de nucleótidos, 16,6% de glicerol,

300 µg/ml vermelho de cresol, 3,3x NH₄, 2,2 mM MgCl₂ e 0,05 U/µL de ampliTaq), 1,8 µl de água *nuclease free*, e 5 µl da mistura de primer (primer forward+primer reverse). O programa usado no termociclador foi o seguinte: 95°C durante 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos de amplificação a 95°C durante um minuto, um minuto à temperatura de *annealing* específica e um minuto a 72°C; por fim cinco minutos a 72°C.

Submeteram-se 10 µl de produto PCR a electroforese, em gel de agarose a 3%, impregnado com Brometo de Etídio, a 120 V durante 35 minutos; os resultados foram visualizados sob luz UV. Na avaliação dos resultados obtidos por MSP, apenas foram valorizadas como positivas as bandas que se apresentavam francamente visíveis.

Análise Estatística

As diferenças na metilação dos genes em estudo nos vários tipos histológicos de CG e GC foram obtidos com base nos testes χ^2 e Exacto de Fisher, tendo-se considerado estatisticamente significativo todos os valores de $p \leq 0,05$. O software utilizado foi o programa *STATISTICA 5.1* (StatSoft Inc., EUA).

RESULTADOS

Nas 55 amostras submetidas ao estudo da metilação nos genes *COX-2*, *CDH1*, *p16^{INK4A}* e *EGFR*, usando a MSP, a metilação das ilhas CpG foi detectada em 94% das amostras de CG para o *CDH1*, 91% para o *COX-2*, 80% para o *p16^{INK4A}* e para o *EGFR* não foi detectada metilação (0%). Nos casos de GC, foi detectada metilação das ilhas CpG em 100% para a caderina-E, 100% para o *COX-2*, 90% para o *p16^{INK4A}* e 20% para o *EGFR* (Figuras 1 e 2 e Quadro 1).

No quadro 2, encontra-se o número de amostras metiladas e não metiladas, do estudo da metilação nos promotores dos genes da caderina-E, p16, COX-2 e EGFR, segundo os vários dados clínico-patológicos relevantes, nos casos de carcinoma gástrico e de gastrite crónica.

Relativamente ao *COX-2*, obteve-se uma percentagem de metilação de amostras de 91,7% para o CG difuso, 100% de metilação para o CG indeterminado e GC e 86,7% para o CG intestinal.

O *EGFR* apresentou 0% de metilação para as amostras

Quadro 1 – Sequência de primers usados na MSP

Nome do primer		Sequência do primer (5'-3')	Nº bases (pb)	TA (°C)	Referências
COX-2	M	TTAGATACGGCGGGCGGGCGGC- forward	161	59	7
		TCTTTACCCGAACGCTTCCG- reverse			
	U	ATAGATTAGATATGGTGGTGGTGGT- forward	171	59	
		CACAATCTTTACCCAAACACTTCCA- reverse			
CDH1	M	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT- forward	115	55	7
		TAACTAAAAATTCACCTACCGAC- reverse			
	U	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT- forward	97	51	
		CACAACCAATCAACAACACA- reverse			
p16	M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC- forward	150	63	7
		GACCCCGAACCGCGACCGTAA- reverse			
	U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT- forward	151	58	
		CAACCCCAAACCACAACCATAA- reverse			
EGFR	M	TGTTTTTTCGCGTTTCGGTTCGCGC- forward	150	53	15
		CGATCTAAACGACGACGACCGCCG- reverse			
	U	TGTTTGTTTTTTTGTGTTTTGGTTTGTGT-forward	150	53	
		CATCCAATCTAAACAACAACAACCACCA- reverse			

M, sequência metilada; U, sequência não metiladaTA, temperatura de *annealing*

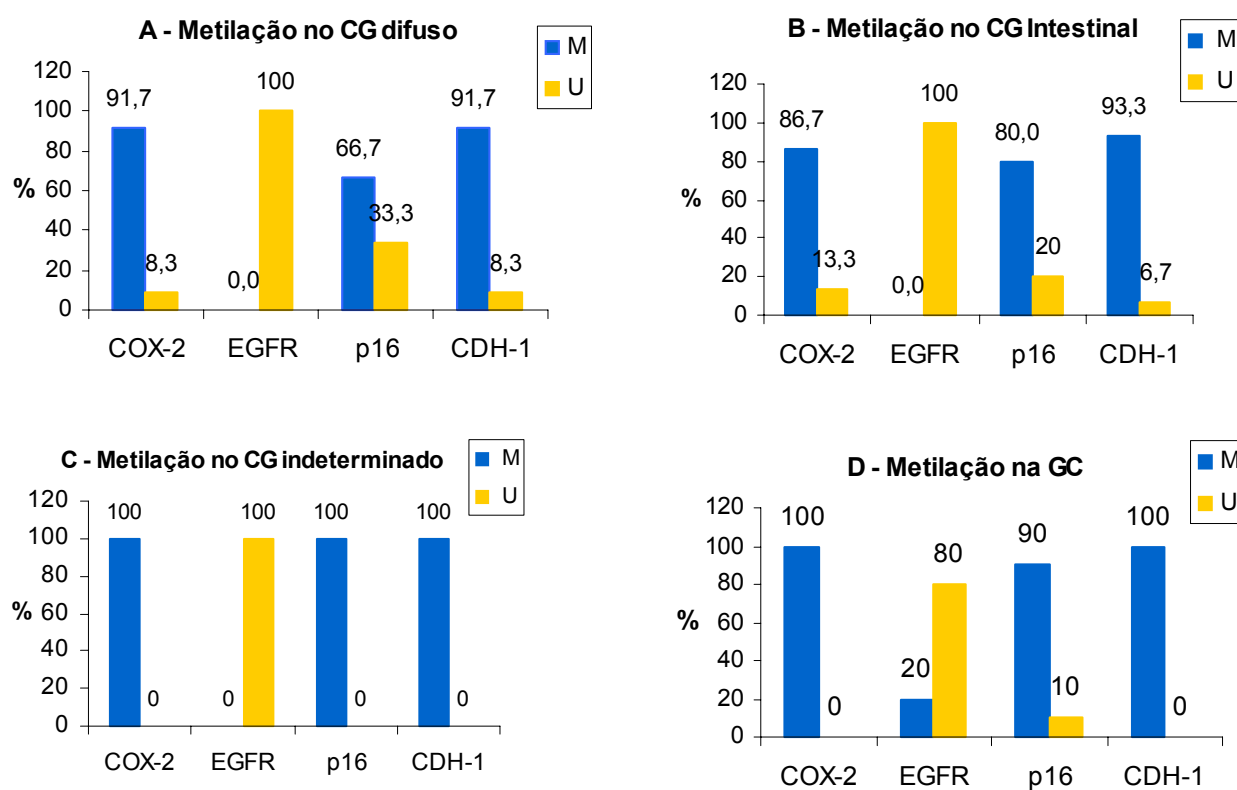
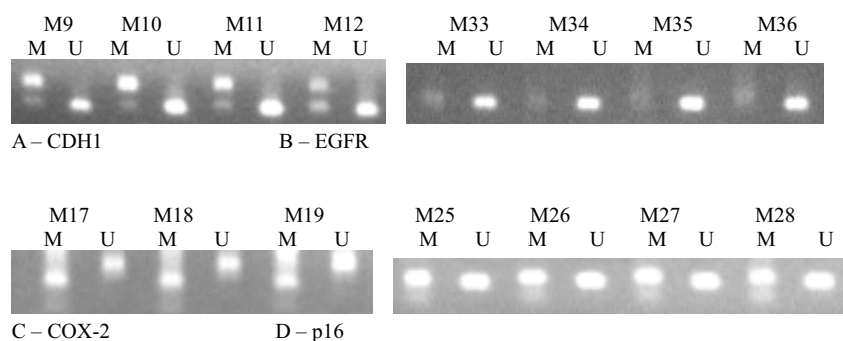


Fig. 2 – Percentagem de metilação e não metilação dos genes do: COX-2, EGFR, p16 e CDH1 no CG difuso (A), CG intestinal (B), CG indeterminado (C), e na gastrite crónica (D) (M – Metilado; U – Não metilado)

em todos os tipos histológicos de CG. Na GC, obteve-se 20% de metilação para as amostras em estudo.

O *p16^{INK4A}* apresentou 66,7% de metilação para o CG difuso, 80% para o tipo intestinal, 100% para o tipo indeterminado e 90% para a GC.

Finalmente, *CDH1* registou as percentagens mais elevadas de metilação: 91,7% para o CG do tipo difuso, 93,3 para o CG do tipo intestinal e 100% para o tipo indeterminado histológicos e GC.

A correlação entre a metilação nos genes e os vários tipos histológicos está descrita no Quadro 3. Registraram-

se diferenças significativas na metilação do gene EGFR na distinção do CG da GC ($p < 0,01$). Ainda para o mesmo gene, encontraram-se diferenças consideráveis na metilação entre o CG do tipo difuso e a GC, assim como, na distinção entre o tipo intestinal e a GC.

A metilação do gene *p16^{INK4A}* apresentava diferenças consideráveis na distinção do CG do tipo difuso e do CG do tipo indeterminado, e ainda na distinção do CG do tipo difuso e da GC.

Existem também diferenças consideráveis no gene *COX-2* na distinção entre o CG do tipo intestinal e a GC.

Quadro 2 – Gastrite Crónica e Carcinoma Gástrico: Correlação da Metilação Genética com a Informação Clínico-patológica

		CDH1			p16		COX-2		EGFR	
		n	P	N	P	N	P	N	P	N
Gastrite Crônica		20	20	0	18	2	20	0	4	16
Sexo	M	8	8	0	8	0	8	0	4	4
	F	12	12	0	10	2	12	0	0	12
Idade	≤ 40	3	3	0	3	0	3	0	1	2
	> 40	17	17	0	15	2	17	0	3	14
Hp	+	10	10	0	8	2	10	0	2	8
	-	10	10	0	10	0	10	0	2	8
CG total		35	33	2	28	7	32	3	0	35
Sexo	M	22	21	1	20	2	22	0	0	22
	F	13	12	1	8	5	10	3	0	13
Classificação Laurén	D	12	11	1	8	4	11	1	0	12
	I	15	14	1	12	3	13	2	0	15
	i	8	8	0	8	0	8	0	0	8
Hp	+	26	24	2	19	7	23	3	0	26
	-	9	9	0	9	0	9	0	0	9

P – positivo; N – negativo; CG – Carcinoma Gástrico; D – Difuso; I – Intestinal; i – Indeterminado; Hp – *Helicobacter pylori*.

Neste estudo não se detectaram diferenças na metilação dos quatro genes na distinção do CG do tipo difuso com o intestinal, do tipo intestinal com o indeterminado e do tipo indeterminado com a GC.

Quadro 3 – Correlação entre o CG – vários tipos histológicos e GC e a Metilação do COX-2, EGFR, p16 e CDH1

	<i>COX-2</i>	<i>EGFR</i>	<i>p16</i>	<i>CDH1</i>
Carcinoma total vs Gastrite C.	0,17	< 0,01	0,33	0,27
Intestinal vs Gastrite C.	0,097	0,076	0,41	0,26
Difuso vs Gastrite C.	0,21	0,10	0,10	0,21
Indeterminado vs Gastrite C.	> 0,999	0,19	0,37	> 0,999
Difuso vs Intestinal	0,68	> 0,999	0,44	0,88
Intestinal vs Indeterminado	0,30	> 0,999	0,19	0,47
Difuso vs Indeterminado	0,42	> 0,999	0,086	0,42

DISCUSSÃO

A metilação aberrante das ilhas CpG é um achado frequente em tumores humanos e representa um mecanismo molecular importante de inativação tumoral de genes supressores no desenvolvimento de cancro, independentemente do tipo histológico⁷. Algumas observações provenientes de vários laboratórios demonstraram que existe hipometilação de proto-oncogenes e hipermetilação de genes supressores na carcinogénese gastrointestinal¹⁶.

Estudos realizados até à data respeitantes à metilação do *COX-2*, não reúnem consenso por parte dos investigadores. Os mecanismos subjacentes à metilação do gene e subsequente expressão do mesmo continuam por elucidar e várias hipóteses têm vindo a ser testadas. A mucosa gástrica humana expressa normalmente, níveis dificilmente detectáveis da proteína do *COX-2* – o gene estará, em princípio, metilado. No entanto, esta proteína tem sido identificada como estando sobre-expressa no CG, sugerindo que o gene não se encontra metilado, cons-

tituindo assim um factor importante no crescimento e desenvolvimento do mesmo^{5,12}.

No presente estudo obtivemos resultados discordantes do estudo de Wang et al no qual foi demonstrado que o *COX-2* não está metilado na maior parte dos casos de CG¹³. No entanto, estudos em linhas celulares humanas de CG SUN-601, realizados por Song et al, referem a total metilação das ilhas CpG, resultados que vêm de encontro aos nossos, uma vez que obtivemos uma percentagem de 91% de metilação para este gene¹⁷. Shi et al não acharam uma associação significativa entre a expressão de *COX-2* e o género, idade, localização do tumor, ou grau de invasão⁵. No entanto, diferenças significativas foram notificadas no que respeita ao tipo histológico. Como foi descrito por Joo et al, a expressão de *COX-2* ocorre mais frequentemente no CG do tipo intestinal que no tipo difuso, podendo associar-se com o nosso estudo na medida

em que se observou a menor percentagem de metilação do gene *COX-2* no CG do tipo intestinal (86,7%)¹⁸.

Os resultados de Wang et al sugerem que a *desmetilação* das ilhas 5'CpG poderão ser um pré-requisito para a expressão do gene *COX-2*. Tal sugere que em estádios precoces do CG, o gene é primeiro desmetilado por mecanismos desconhecidos e transcrito, podendo indicar que a *COX-2* está envolvida no crescimento do CG e que promove a transformação maligna^{5,13}. É importante referir que no nosso estudo, o gene *COX2* se encontrou metilado nos casos de gastrite crónica.

O *EGFR* desempenha um papel importante na regulação da proliferação e progressão das células normais, pré-neoplásicas e neoplásicas no CG. Nagothu et al, obtiveram dados que sugerem que o ácido fólico (AF) e seus metabólitos proveniente da dieta, inibem a actividade promotora do *EGFR* em células de cancro do cólon através do aumento da metilação da sua região promotora. Estes autores postulam que o AF constitui o dador primário de grupos metil no processo de metilação, desempenhando, subsequentemente, um papel crucial na modulação da expressão do gene¹⁵. Os resultados obtidos no nosso estudo revelam a existência de diferenças consideráveis na distinção entre o CG do tipo difuso e a GC e ainda na distinção entre o CG do tipo intestinal e a GC. Obtiveram-se ainda diferenças significativas na metilação do *EGFR* entre os casos de CG, sem diferenciação em tipos histológicos, e os de GC ($p < 0,01$). Este resultado traduz-se por uma percentagem de metilação do gene de 0% no CG e de 20% na GC (Figura 2, gráfico B), vindo ao encontro do estudo de Slesak et al no qual demonstrou o aumento da expressão da proteína EGFR no carcinoma gástrico em comparação com GC¹⁹. Um estudo de Pelaez et al demonstrou que a expressão da proteína do EGFR está aumentada no CG, comparando com controlos de mucosa gástrica normal, podendo sugerir um mecanismo semelhante ao do gene *COX-2* em que a *desmetilação* do gene numa fase precoce da carcinogénese, poderá conduzir à transformação maligna do tecido²⁰.

Wehbe et al verificaram expressão aumentada da citocina inflamatória interleucina-6 (IL-6) no colangiocarcinoma e também metilação reduzida do promotor do *EGFR* com expressão aumentada do gene e da proteína. Tal poderá provocar a diminuição da sensibilidade das células tumorais às terapêuticas que usam agentes desmetilantes, com graves repercussões no tratamento do cancro²¹. Neste contexto, e uma vez que elevados níveis de proteína *EGFR* tem sido detectada em CG com pior prognóstico, a inibição da função do *EGFR* poderá constituir uma estratégia terapêutica ou de quimioprevenção nesta neoplasia^{22,23}.

A activação do *EGFR* pode ser inibida pela acção de anticorpos ou pequenas moléculas inibidoras da actividade tirosina-cinase. Woodworth et al detectaram que a expressão de vários genes anti-apoptóticos se encontrava diminuída após tratamento com um inibidor específico e reversível da tirosina-cinase. Assim, a inibição da função do *EGFR* poderá fomentar o efeito apoptótico de diversos agentes como a radiação e a quimioterapia²⁴.

Actualmente já existem drogas aprovadas responsáveis pela inibição da tirosina-cinase em diversas neoplasias, nomeadamente, o Gefitinib (Iressa®) para tratamento do cancro do pulmão. No entanto, existem escassos estudos e apenas dados preliminares sobre as drogas actualmente disponíveis no uso clínico para o CG, como por exemplo, Trastuzumab, Cetuximab, Bevacizumab, Gefitinib, Erlotinib e o Imatinib²².

Foi anteriormente descrito que o tecido gástrico exposto ao ácido acetilsalicílico, droga anti-inflamatória não esteróide, expressa elevados níveis de EGFR. A interligação por regulação positiva entre o *COX* e o *EGFR*, originou a investigação de um potencial sinergismo na inibição simultânea destas duas moléculas. Dados preliminares indicam que o ácido acetilsalicílico poderá modular a expressão e activação do EGFR em células de CG, tornando-as mais susceptíveis à terapêutica com Gefitinib²².

A hipermetilação do gene *p16^{INK4A}* tem sido considerada como um importante mecanismo de inactivação deste gene no CG¹¹. Segundo Iida et al, o padrão de metilação deste gene é relativamente específico para o tumor e ocorre largamente no CG do tipo intestinal²⁵. Sun et al obtiveram resultados no seu estudo que sugerem que a metilação do *p16^{INK4A}* é um evento que ocorre num estágio muito precoce da carcinogénese, nomeadamente na displasia, e que poderá constituir um potencial marcador para prever o potencial maligno de uma displasia¹¹. Os nossos resultados apontam diferenças consideráveis na metilação das amostras entre o CG difuso e CG indeterminado e entre o CG difuso e a gastrite crónica (Quadro 3). Obtivemos elevada percentagem de metilação das amostras para a GC (obteve-se 90% de amostras metiladas) sem correlação com presença de lesões pré-neoplásicas, inexistentes nos casos seleccionados. (Figura 2, Gráfico B).

No caso da caderina-E, os resultados obtidos no presente estudo não se revelaram significativos, nem se encontraram diferenças consideráveis na comparação da metilação entre os diferentes tipos histológicos de CG e GC. Pela análise dos gráficos da Figura 2, podemos verificar que existe metilação da quase totalidade das amostras em todos os tipos histológicos de CG, e inclusivamente, na totalidade das amostras de GC, indicando assim que

outros genes estão também implicados na progressão do carcinoma gástrico.

Os estudos realizados por Waki et al e Kang et al, sugerem que a metilação do *CDH1* e *p16^{INK4A}* está relacionada com a idade, enquanto que a metilação de genes como o *hMLH1*, não possuem associação com a idade, em tecidos não neoplásicos^{7,26}. A metilação *CDH1* e *p16^{INK4A}* ocorre no epitélio gástrico não neoplásico aproximadamente aos 40 anos de idade e foi encontrado em epitélio gástrico não neoplásico obtido de autópsias e pacientes com CG²⁶.

Vários factores poderão contribuir para a metilação associada à idade, nomeadamente, carcinogénicos exógenos, espécies reactivas de oxigénio endógenas, diferenças genéticas do hospedeiro e *Helicobacter pylori*^{7,26}. Uma vez que a média de idades das nossas amostras de CG era muito elevada ($65,8 \pm 11,8$ anos) não se pode deduzir que a metilação de *CDH1* e *p16^{INK4A}* fosse proveniente apenas da presença de CG, pois também se acharam percentagens elevadas de metilação na GC (idade média de 57 ± 13 anos), indo de encontro aos dados revelados pelos estudos anteriormente referidos.

Deste modo, poderá ser necessário repensar o uso destes dois genes como potenciais marcadores de CG devido à sua diminuída especificidade relativamente ao CG, como também é sugerido pelo estudo de Waki et al²⁶.

À luz dos resultados obtidos neste trabalho, seria interessante completar a análise da metilação com o estudo da expressão génica dos respectivos genes e das respectivas proteínas por imuno-histoquímica, numa amostra populacional mais significativa.

Um estudo paralelo com amostras de tecido gástrico normal de pacientes novos constituiria um grupo controlo fidedigno para questões ainda ambíguas, como a idade dos pacientes estudados, a existência de infeções por *Helicobacter pylori* e possíveis lesões pré-neoplásicas.

No entanto, ficou patente a importância da desmetilação do *COX2* na evolução do carcinoma gástrico, que é interpretada como um evento precoce a que se associa o potencial de progressão metastização dependente do *EGFR*. Estas conclusões são demonstradas pelas diferenças estatísticas verificadas quando se comparam os resultados obtidos nos casos de carcinoma gástrico e de gastrite crónica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Ana Gomes, Maria João Falcão, Patrícia Couceiro do Instituto de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela colaboração no desenvolvimento deste estudo.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, PISANI P: Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55 (2):74-108
2. Choi IS, Wu TT: Epigenetic alterations in gastric carcinogenesis. *Cell Res* 2005; 15(4):247-254
3. LYNCH HT, GRADY W, SURIANO G, HUNTSMAN D: Gastric cancer: new genetic developments. *J Surg Oncol* 2005;90(3):114-133
4. KANYAMA Y, HIBI K, NAKAYAMA H et al: Detection of p16 promoter hypermethylation in serum of gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2003;94(5):418-420
5. SHI H, XU JM, HU NZ, XIE HJ: Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9(7):1421-6
6. GRAZIANO F, ARDUINI F, RUZZO A et al: Prognostic Analysis of E-Cadherin Gene Promotor Hypermethylation in Patients with Surgically Resected, Node-Positive, Diffuse Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2784-9
7. KANG GH, LEE H J, HWANG KS, LEE S, KIM JH, KIM JS: Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003;163(4):1551-6
8. WU Z Y, ZHAN W H, LI J H et al: Expression of E-cadherin in gastric carcinoma and its correlation with lymph node micrometastasis. *World J Gastroenterol* 2005;11(20):3139-43
9. ZHENG ZH, SUN XJ, ZHOU HT, SHANG C, JI H, SUN KL: Analysis of metastasis suppressing function of E-cadherin in gastric cancer cells by RNAi. *World J Gastroenterol* 2005;11(13):2000-3
10. TANG S, LUO H, YU J, YANG D, SHU J: Relationship between alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) genes of CDKN2A locus and gastric carcinogenesis. *Chin Med J* 2003;116(7):1083-7
11. SUN Y, DENG D, YOU WC et al: Methylation of p16 CpG islands associated with malignant transformation of gastric dysplasia in a population-based study. *Clin Cancer Res* 2004; 10(15):5087-93
12. XUE YW, ZHANG QF, ZHU ZB, WANG Q, FU SB: Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(2):250-253
13. WANG BC, GUO GQ, SUN QL, LIU GY, LI DG: Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(21):3240-4
14. GARCIA I, VIZOSO F, MARTIN A, SANG L, ABDEL-LAH O, RAIGOSO P: Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in respectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2003;10(3):234-241
15. NAGOTHU KK, RISHI AK, JASZEWSKI R, KUCUK O, MAJUMDAR AP: Folic acid-mediated inhibition of serum-induced activation of EGFR promoter in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(3):541-6
16. FANG J, YANG L, ZHU H et al: 5-aza-2'-deoxycytidine in-

- duces demethylation and up-regulates transcription of p16^{INK4A} gene in human gastric cancer cell lines. *Chin Med J* 2004;117(1):99-103
17. SONG SH, JONG HS, CHOI HH et al: Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61(11):4628-35
 18. JOO YE, OH WT, REW JS, PARK CS, CHOI SK, KIM SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion* 2002;6:222-229
 19. SLESIAK B, HARLOZINSKA A, POREBSKA I et al: Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis. *Anticancer Res* 1998;18(4A):2727-32
 20. PELAEZ BUJAN MDEL C, RUIBAL MORELL A, AZA GONZALEZ J: Gastric carcinoma: expression of c-erbB-2/neu oncoprotein, epidermal growth factor receptor, cathepsin D, progesterone receptor and tumor associated glycoprotein-72 in different histological types. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91(12):826-837
 21. WEHBE H, HENSON R, MENG F, MIZE-BERGE J, PATEL T: Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res* 2006;66(21):10517-24
 22. BECKER JC, MÜLLER-TIDOW, SERVE H, DOMSCHKE W, POHLE T: Role of the receptor tyrosine kinase in gastric cancer: New targets for a selective therapy. *W J Gastroenterol* 2006;12(21):3297-3305
 23. ARNOLD D, PEINERT S, VOIGT W, SCHMOLL HJ: Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Present and Future Role in Gastrointestinal Cancer Treatment: A Review. *Oncologist* 2006;11:602-611
 24. WOODWORTH C D, MICHAEL E, MARKER D, ALLEN S, SMITH L, NEES M: Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulates inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol Cancer Ther* 2005;4(4):650-8
 25. IIDA S, AKIYAMA Y, NAKAJIMA T, ICHIKWA W et al: Alterations and hypermethylation of the p14(ARF) gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 2000;87:654-8
 26. WAKI T, TAMURA G, TSUCHIYA T, SATO K, NISHIZUKA S, MOTOYAMA T: Promoter methylation status of E-cadherin, hMLH1, and p16 genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 2002;161(2):399-403



Hospital da Universidade de Coimbra. Coimbra